

应用过氧化物酶同工酶鉴定山茶属植物杂种 F1 代的研究

王仲朗 夏丽芳

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 对 4 个杂交组合的 12 个杂种 F1 代植株与亲本进行了形态学比较和过氧化物酶同工酶分析, 结果表明以金花茶为父本, 云南山茶或云南野山茶为母本杂交产生的 11 个杂种的幼枝、叶的特征均与母本相似, H-86-1-1 的花与母本一致, H-87-2-2 的花兼有父母本的特征; H-78-1-1 的幼枝、叶的特征与父本相似, 其花也兼有父母本的特征。有 9 株的酶谱为“互补型酶带”, 且都出现了杂种带, 为真正的杂种; 其余 2 株的酶谱与母本一致, 与其形态特征表现出一定的相关性, 可能为非真正的杂种。同一个杂交组合产生的杂种, 酶谱却有差异, 金花茶最为特征的一条带 ($R_f=0.813$) 在其所有 11 个杂种 F1 代植株中均未表达。

关键词 山茶属; 过氧化物酶同工酶; 形态学比较; 杂种

APPLICATION OF PEROXIDASE ISOZYMES TO IDENTIFICATION F1 HYBRIDS OF CAMELLIA

WANG Zhong-Lang, XIA Li-Fang

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract In this paper 12 F1 hybrids of four combinations were compared with their parents in morphology and peroxidase isozymes, the results indicated that: (1) Certain morphological characters may be used for initial identification of F1 hybrids. (2) Nine of all hybrids display both parental bands except one peculiar band of *C. chrysantha*, and possess “hybrid” – bands not observed in either parent; zymograms of the two other plants are the same as female parents, possibly not true hybrids. (3) The F1 hybrids produced from *C. chrysantha*, *C. reticulata* or *C. pitardii* var. *yunnanica* express various zymograms. Based on the above, we propose that it is a much effective method to identify F1 hybrids by using peroxidase isozyme variations.

Key words *Camellia*; Peroxidase isozymes; Morphological comparison; Hybrid

山茶花是中国的十大名花之一, 其杂交育种工作一向受到育种工作者的重视, 培育出重瓣且开黄色或蓝紫色花、有香味、树型好的品种是茶花爱好者梦寐以求的目标。金花茶 (*C. chrysantha*) 是我国的一级保护植物, 小花山茶 (*C. forrestii*) 具有香味, 都是重要的育种材料。由于山茶属植物是常绿的灌木或乔木, 育种周期长, 很有必要在早

期鉴定杂种 F1 代。目前有报道从形态学^[1]、生化学^[2]角度对山茶属植物杂种 F1 代进行鉴定。过氧化物酶同工酶是单基因编码的单肽链酶, 目前已被广泛应用于白菜^[3-5]、栗树^[6]、一品红^[7]、相思树^[8]等植物杂种 F1 代的早期鉴定, 但尚未见应用于山茶属植物的报道。

材料与方法

本文所用材料列于表 1, 均定植于本所植物园中。亲本的种子、幼枝、叶及花的特征都是实地观察每一个植株并结合 Sealy^[9]、胡先骕^[10]的描述得到的, 与杂种 F1 的比较结果列于表 2。由于山茶属植物的叶子富含丹宁、酚类物质、酚氧化酶等, 细胞破碎后, 酚类物质很容易被氧化为醌, 醌极易与酶复合而使酶失活^[11]。本文经比较实验, 选用 6 年龄株上的成熟健康叶, 在液体氮下研成粉末, 加入适量的磷酸缓冲液 (pH=6.5) 内含 0.01mol/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0.005mol/l EDTA, 0.5% 牛血清白蛋白, 0.005mol/l 抗坏血酸。半小时后, 在 17000rpm、4℃ 下离心 10 分钟, 取上清液。电泳采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶不连续电泳系统, 分离胶浓度为 6%, 凝胶缓冲液为 Tris-HCl, pH=8.8, 浓缩胶浓度为 3%, 缓冲液为 Tris-HCl, pH=6.8, 电极缓冲液为 Tris-Gly, pH=8.3, 电泳在 150 伏、4℃ 水循环中进行, 染色采用醋酸联苯胺法^[12]。根据 Rf 值大小和酶谱强弱绘模式图, 并做干板及照相。

表 1. 用于过氧化物酶同工酶分析的杂种及其亲本名录

Table 1. List of hybrids and their parents in analysing peroxidase isozymes

编号 No.	母本 Female parent	父本 Male parent	授粉 时间 Date of pollination	首花时间 First flowering time
H-87-1-1	云南野山茶 <i>C. pitardii</i> var <i>yunnanica</i>	金花茶 <i>C. chrysantha</i>	87 年 12 月	—————*
H-87-1-2			87 年 12 月	—————
H-87-1-3			87 年 12 月	—————
H-86-1-1	云南山茶 cv. 宫 粉 <i>C. reticulata</i> cv. Pink Palace	金花茶 <i>C. chrysantha</i>	86 年 1 月	90 年 11 月 28 日
H-87-9-1			87 年 1 月	—————
H-87-9-2			87 年 1 月	—————
H-87-9-3			87 年 1 月	—————
H-87-9-4			87 年 2 月	—————
H-87-2-1	云南山茶实生苗 <i>C. reticulata</i> Seedling	金花茶 <i>C. chrysantha</i>	87 年 12 月	—————
H-87-2-2			87 年 1 月	—————
H-87-2-3			87 年 1 月	—————
H-78-1-1	云南山茶 <i>C. reticulata</i>	小花山茶 <i>C. forrestii</i>	78 年 12 月	82 年 12 月 1 日

* ———表示还未开花 Note: ———too young to bloom

结果与分析

亲本与杂种 F1 代形态学比较

(1) 幼枝与叶片的形态学比较 从表 2 可以看出, 以金花茶为父本, 云南山茶或云南野山茶为母本, 杂交产生的 F1 代, 幼枝与叶的特征都与母本相似, H-78-1-1 的幼枝与叶的特征与父本小花山茶相似。

(2) 花结构的比较 H-86-1-1 的花各部分的特征与母本“宫粉”完全一致 (表 2), 只是花期 (始花 11 月 28 日) 比“宫粉” (始花 12 月底) 早些, 而父本金花茶的花特征未表达。H-87-2-2 的花兼有父母本的特征, 其花蕾近球形, 花柄长 0.3—0.4cm, 花柱 3—4 条而象父本金花茶, 其余特征都与母本云南山茶实生苗相似。H-78-1-1 也兼有父母本的特征, 其花白色、微带红晕, 花径 4.5cm 介于两亲本之间; 其子房被白色柔毛而象母本; 其余特征如无花柄、具香味、花柱长 0.9cm 等都与父本相似。

表 2. 杂种 F1 代形态学特征的初步鉴定

Table 2. Morphological characters used for initial identification of interspecific hybrids

杂 种	幼 枝		叶 片					花								
	毛被	颜色	大小	颜色	中脉	细脉	边缘	花柄	花蕾	香味	花色	花径	花瓣	花柱	柱头	子房
H-87-1-1	f	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-87-1-2	f	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-87-1-3	f	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-86-1-1	s	f	f	f	s	f	f	f	f	s	f	f	f	f	f	f
H-87-9-1	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-87-9-2	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-87-9-3	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-87-9-4	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-87-2-1	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-87-2-2	s	f	f	f	s	f	f	m	m	s	f	f	f	m	m	f
H-87-2-3	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-87-1-1	m	m	m	s	m	m	m	m	m	m	i	i	m	m	s	f

注: m—象父本; f—象母本; i—中间特征; s—与双亲相似的特征。

Note: m—resemblance to male parent; f—resemblance to female parent;

i—intermediate characters; s—characters similar to both parents.

(3) 子叶和下胚轴比较 金花茶具 2—6 个子叶, 多数为 3 个, 子叶及下胚轴从深红到紫红色, 云南山茶和云南野山茶都具 2 个子叶, 子叶及下胚轴白色到黄白色, 云南山茶 × 金花茶、云南野山茶 × 金花茶真正的杂种一般有 2 个子叶, 少数有 3 个子叶, 子叶及下胚轴一般为红色, 因此, 子叶及下胚轴的颜色表现是早期鉴别以金花茶为父本的 F1 代的简捷方法。

过氧化物酶同工酶分析

云南野山茶与金花茶的杂种 F1 代 3 个植株的酶带数都明显地比父母本多, 母本云

南野山茶的 3 条酶带在 3 个 F1 代都有表现, 父本金花茶 5 条带中的 4 条 (R_f 值分别为 0.550, 0.314, 0.225, 0.186) 在 F1 代也有表现, 但金花茶最为特征的一条带 ($R_f=0.813$, 该酶带泳动速度很快在我们所做的 22 种山茶中都未检测到) 在 3 个 F1 代植株都未表达。这 3 个 F1 代植株都出现了父母本所没有的杂种带, 但其间的酶谱有差异 (图 1: 2, 3, 4; 图 3: C, F)。

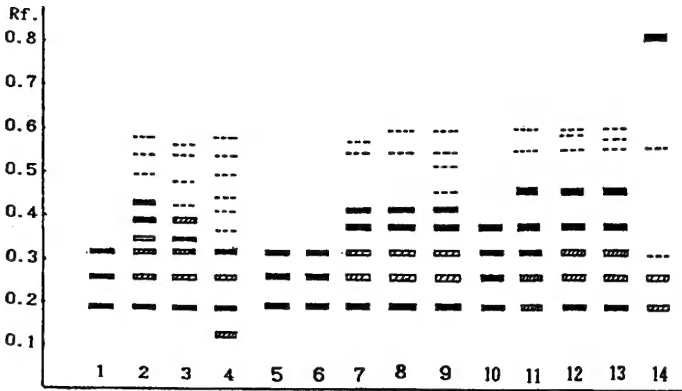


图 1. 金花茶、云南山茶、云南野山茶及其杂种的过氧化物酶同工酶模式图

Fig.1. Peroxidase isozyme spectrum

1. *C. pitardii* var. *yunnanica*; 2. H-87-1-1; 3. H-87-1-3; 4. H-87-1-2; 5. *C. reticulata* cv. "Pink Palace"; 6. H-86-1-1; 6. H87-9-3; 7. H-87-9-1; 8. H-87-9-2; 9. H-87-9-4; 10. *C. reticulata* cv. "Seedling"; 11. H-87-2-2; 12. H-87-2-1; 13. H-87-2-3; 14. *C. chrysantha*

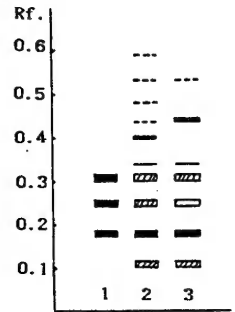


图 2. 云南野山茶、小花山茶及其杂种的过氧化物酶同工酶模式图

Fig.2. Peroxidase isozyme spectrum

1. *C. pitardii* var. *yunnanica*;
2. H-78-1-1; 3. *C. forrestii*

云南山茶品种“宫粉”与金花茶杂交产生的 5 个 F1 代, 按酶谱可分为两类: 第一, F1 代的酶谱与母本“宫粉”完全一致, 既无父本的特征带, 也不出现杂种带, 这一类包括 H-86-1-1, H-87-9-3 (图 1: 6; 图 3: C)。第二, F1 代表现母本所有的带, 父本的 4 条带也有表达, 但另一条最为特征的带 ($R_f=0.813$) 在 F1 代都未表达, 还出现了杂种带, 其间的酶谱有差异 (图 1: 7, 8, 9; 图 3: D, E)。

云南山茶实生苗与金花茶杂交产生的 3 个 F1 代植株之间的酶谱较为一致, 母本云南山茶实生苗的 4 条带在 F1 代都有表达, 父本金花茶的 4 条带也有表达, 但最为特征的一条带未表达, 都出现了杂种带, 其间的酶谱也有差异 (图 1: 11, 12, 13; 图 3: D, E)。

从以上 3 个以金花茶为父本的杂交组合之杂种 F1 代的过氧化物酶同工酶分析中可看出, 除 2 株外, 其余 9 株的酶谱为“偏母本的互补型”, 这与形态特征表现出一定的相关性。

云南野山茶与小花山茶的杂种 F1 代 (H-78-1-1) 兼有父母本的所有酶带, 并出现了 3 条杂种带。(图 2; 图 3: F)

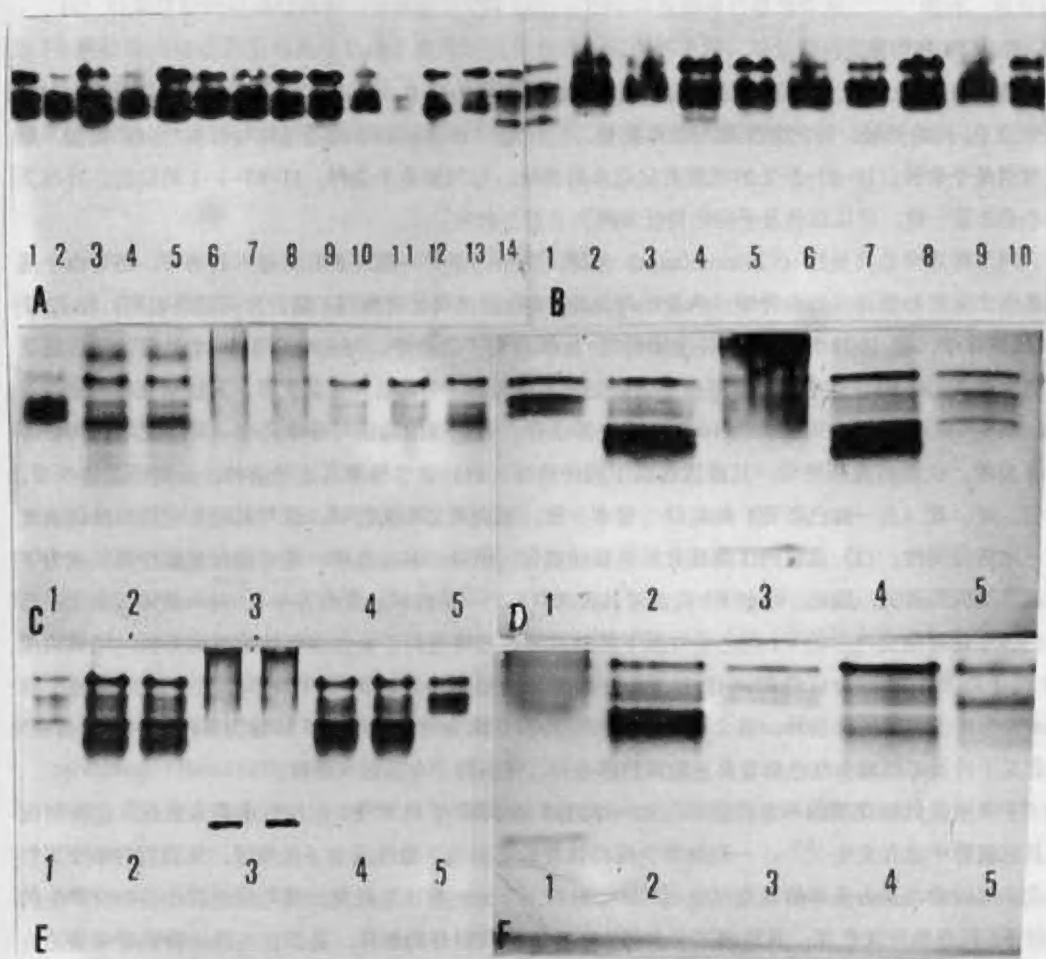


图3 酶谱照片

Fig.3 Photograph of peroxidase zymogram

A. Cultivars of *C. reticulata*: 1. Lion's Head 2. Early Crimson 3. Early Paeony 4. Super Chrysanthemum Petal 5. Super Paeony 6. Baby Face 7. Dwarf Rose 8. Chrysanthemum Petal 9. Red-mume 10. Golden Stamen Hibiscus 11. "132" 12. Seedling 13. Seedling 14. Pink Palace

B. Cultivars of *C. reticulata*: 1. f. simplex 2. Pink Palace 3. "132" 4. Seedling 5. Dwarf Rose 6. Red-mume 7. Baby Face 8. Early Paeony 9. Chrysanthemum Petal 10. Golden Stamen Hibiscus

C. 1. *C. pitardii* var. *yunnanica* 2. H-87-1-2 3. *C. chrysantha* 4. H-87-9-3 5. *C. reticulata* cv. Pink Palace

D. 1. *C. reticulata* Seedling 2. H-87-2-1 3. *C. chrysantha* 4. H-87-9-2 5. *C. reticulata* cv. Pink Palace

E. 1. *C. reticulata* cv. Pink palace 2. H-87-9-4 3. *C. chrysantha* 4. H-87-2-3 5. *C. reticulata* Seedling

F. 1. *C. chrysantha* 2. H-87-1-3 3. *C. pitardii* var. *yunnanica* 4. H-87-1-1 5. *C. forrestii*

讨 论

杂种 F1 代的鉴定

亲本与杂种 F1 代的形态学比较结果表明,以金花茶为父本,云南山茶或云南野山茶为母本杂交产生的 F1 代的幼枝、叶的特征都与母本相似,已开花的 H-86-1-1 的花结构与母本“宫粉”相似,难以判别是个杂种, H-87-2-2 的花兼有父母本的特征,可判别是个杂种。H-87-1-1 的幼枝、叶与父本小花山茶一致,可从花色及子房的特征来判别是否为杂种。

同工酶通常是共显性 (Co-dominant) 遗传,真正的杂种一般应兼有父母本的酶带,还可由于基因重组产生有异于双亲的杂种带。从亲本与杂种 F1 代的过氧化物酶同工酶的分析结果表明,在 12 个 F1 代植株中,有 10 株出现了“互补型酶谱”,且都出现了杂种带,与云南山茶 14 个品种的酶谱显著不同 (图 3: A, B), 这些品种有好处是从自交种子得到的,如宫粉、金蕊芙蓉,其过氧化物酶谱与云南山茶完全一致,因此可认为这 10 株是真正的杂种。另 2 株的酶谱与母本完全一致,父本的特征带没有表现,也未出现杂种带,其原因有以下两种情形: (1) 这 2 株非真正的杂种。从其形态特征看,幼枝、叶、花 (有一株已开花) 的特征与母本一致,未表现父本的性状,这与其过氧化物酶酶谱表现出一定的相关性。(2) 虽说同工酶通常是共显性遗传,但并不总是这样,还可能有显隐性关系或为下位基因编码等有关,因此,杂种 F1 代也可只表现双亲之一的性状。夏丽芳等^[1]对六倍体云南山茶与二倍体金花茶杂交产生的 F1 代之子叶及下胚轴的颜色表现进行了染色体倍性的对比分析,结果表明 F1 代子叶及下胚轴为红色的,有 98.7% 为真正的四倍体杂种,而子叶及下胚轴为黄白色的,有 26.9% 为真正的四倍体杂种。这 2 株是否为真正的四倍体杂种而子叶及下胚轴为黄白色中的一员呢?或者是子叶及下胚轴为红色而非真正的四倍体杂种,还有待于今后深入研究。

上文中提到金花茶的一条特征带 ($R_f=0.813$) 在其所有 11 个 F1 代植株中都未表达,这种情况在其它植物中也有发生^[4,7],一般解释为编码该带的基因处于隐性或为下位基因。从我们的杂交工作及众多的以金花茶为亲本的杂交试验^[13,14]中可知,不论正交还是反交,其与红色花山茶杂交产生的杂种 F1 代总是开红色花,其原因二十多年来一直未得到很好的解释,是否正与这条特征带未表达有关呢,编码该酶带基因在哪条染色体上,这些很值得进一步研究。

杂种 F1 代的酶谱多样性

分析结果表明,同一个杂交组合产生的 F1 代,酶谱表现却有差异,其中以云南山茶品种“宫粉”与金花茶杂交产生的杂种 F1 代间的差异最为显著,云南野山茶与金花茶杂交产生的杂种 F1 代间的差异次之,云南山茶实生苗与金花茶杂交产生的杂种 F1 代间的差异最小 (图 1)。分析其原因,主要有以下两个方面:

(1) 亲本为杂合子 山茶属植物是异花授粉植物,自花结实率极低,且许多种之间都有较高的亲和性^[14]。异花授粉,特别是不同株之花,必然导致种内及种间频繁的基因交流,杂合度相应地会比自花授粉的种高。Brown^[15]等以 10 种针叶树和 6 种阔叶树的种群分析结果与草本植物进行了比较,发现异交种群的期望杂合度 (H_e) 为 0.283—0.293,而自交种群为 0.133,异交种群体的杂合度明显地比自交种群体高。所以,在种内和种间都有很高亲和力的云南山茶或云南野山茶,经过无数代的自然授粉和至少几百年的人工繁殖,杂合度可能较高。从减数分裂看^[16],采自云南腾冲沙坝林场的云南山茶在中期 I 形成了各种价体,表现出一定的杂合性,而金花茶在中期 I 形成稳定的二价体,因此,用于杂交的云南山茶或云南野山茶的基因可能不纯,导致 F1 代发生基因分离,从而表现出酶谱的差

异。

(2) 过氧化物酶翻译后修饰 有证据表明, 过氧化物酶具有翻译后修饰作用^[4,7], 因此, 也可认为 F1 代植株间酶谱表达的差异是由于植株间生理条件等因素的不同, 导致翻译后修饰的差异, 从而表现出酶谱的差异。但同一个山茶种之 14 个品种间的过氧化物酶谱, 经多次重复都非常一致 (图 3: A, B), 因此, 我们认为过氧化物酶翻译后修饰是导致 F1 代酶谱多样性的一个方面, 而不是主要原因。

参考文献

- (1) Xia L F, Gu Z J, Na H Y. et al. An easy technique to isolate true F1 Hybrids from the seedling pools obtained from artificial cross - pollination directly involved yellow - flowered *Camellia chrysanthra*. *Acta Bot Yunnanica* 1987; 9(1):59 — 64
- (2) Nagata T, Sakai S. Caffeine, flavanal and amino acid contents in leaves of hybrids and species of the section *Dubiae* in the genus *Camellia*. *Japan J Breed* 1985; 35:1 — 8
- (3) 李玉湘. 白菜不同杂交组合过氧化物酶同工酶的研究. 园艺学报 1980; 7(4): 20 — 24
- (4) Iwasaki F. Zymogram analysis in Brassica species. *Jap J Breed* 1983; 33(2): 173 — 177
- (5) Kato M, Tokumasu S. An electrophoretic study of esterase and peroxidase isozymes in *Brassicoraphanus*. *Euphytica* 1979; 28:339 — 349
- (6) 时兴春. 杂种栗树的过氧化物酶同工酶的研究. 林业科技通讯 1984; 8:9 — 10
- (7) Wermer D J, Sins K C. Identification of poinsettia cultivars by electrophoretic analysis of proteins and peroxidase. *J Hered* 1977; 18:35 — 40
- (8) 江涛, 潘富俊, 马复京等. 直干相思树与耳荚相思树天然杂交之过氧化物酶同工酶佐证图. 中华林学季刊 1989; 22(4): 107 — 109
- (9) Sealy R J. A revision of Genus *Camellia*. London and Colchester: Spottiswoode, Ballantyne and Company Limited press, 1958: 168 — 191
- (10) 胡先骕. 山茶与连蕊茶属新种与变种 (一). 植物分类学报 1965; 10(2): 131 — 142
- (11) Loomis W D, Battaile J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 1966; 5: 423 — 438
- (12) 胡能书, 万国贤. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 23 — 24
- (13) Hagiya K. Studies on interspecific hybridization of *Camellia*. *Bull Seibu Maizura Bot Inst* 1986; 2:1 — 24
- (14) Parks C R. Cross - compatibility studies in the genus *Camellia*. *International Camellia Journal* 1990; 10: 37 — 54
- (15) Brown A H D, Moran G F. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: Conkle M T. et. al. Isozymes of North American forest trees and forest insect U S D A, 1980: 1—10
- (16) Xiao T J, Gu Z J, Xia L F et al. A karyomorphological study of ten species of Chinese *Camellia*. *La Kromosomo* 1991; II — 61: 2051—2058